

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Biologická aktivita obsahových látek rostlin XIV.

Alkaloidy *Papaver somniferum* L. a jejich účinek na acetylcholinesterasu

Biological activity of plant metabolites XIV.

Alkaloids of *Papaver somniferum* L. and their activity to acetylcholinesterase

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

Dolní Lutyně, 12. května 2010

Petra Suchánková

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Tento výstup vznikl v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu 2010-SVV-2010-261-002.

Dolní Lutyně, 12. května 2010

.....
podpis

Chtěla bych poděkovat panu doc. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za odborné vedení mé diplomové práce, za jeho cenné rady a připomínky, trpělivost a veškeré poskytnuté materiály. Za změření hmotnostních spekter bych chtěla poděkovat Ing. Lucii Cahlíkové, PhD. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celému kolektivu katedry farmaceutické botaniky a ekologie za pomoc při řešení teoretických a technických problémů a všem, kteří jakýmkoliv způsobem přispěli ke vzniku této diplomové práce. Také děkuji svým rodičům, kteří mi byli vždy oporou.

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. CÍL PRÁCE	10
3. TEORETICKÁ ČÁST	12
3.1 Alzheimerova choroba	13
3.1.1 Charakteristika demence	13
3.1.2 Historie vzniku Alzheimerovy choroby	13
3.1.3 Charakteristika Alzheimerovy choroby	13
3.1.4 Terapie Alzheimerovy choroby	15
3.1.4.1 Kognitivní farmakoterapie	16
3.1.4.2 Nekognitivní farmakoterapie	17
3.1.5 Enzym acetylcholinesterasa a butyrylcholinesterasa	18
3.2 Přírodní látky perspektivní pro léčbu Alzheimerovy choroby	19
3.2.1 Inhibitory acetylcholinesterasy	19
3.2.2 Uvolňovače acetylcholinu	20
3.2.3 Látky s antioxidačním účinkem	20
3.2.4 Látky ovlivňující produkci a toxicitu beta-amyloidu	20
3.2.5 Inhibitory propylendopeptidasy	21
3.3 <i>Papaver somniferum</i> L.	22
3.3.1 Synonyma	22
3.3.2 Systematické zařazení <i>Papaver somniferum</i> L.	22
3.3.3 Botanický popis	22
3.3.3.1 Popis čeledi	22
3.3.3.2 Popis rostliny	23
3.3.4 Ekologie	23
3.3.5 Celkové rozšíření	23
3.3.6 Obsahové látky	24
3.3.6.1 Rozdělení alkaloidů	24
3.3.7 Farmakologické účinky obsahových látek	26

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
4.1 Všeobecné postupy	29
4.1.1 Destilace a odpařování	29
4.1.2 Chromatografie	29
4.1.2.1 Tenkovrstvá chromatografie	29
4.1.2.2 Sloupcová chromatografie	29
4.2 Materiál a vybavení	29
4.2.1 Rozpouštědla a chemikálie	29
4.2.2 Chemikálie a materiál ke stanovení účinku erytrocytární AchE (IC ₅₀)	30
4.2.3 Přístroje	31
4.2.4 Detekční činidla	31
4.2.5 Chromatografické absorbenty	31
4.2.6 Vytvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii	32
4.3 Postup izolace alkaloidů z <i>Papaver somniferum</i> L.	32
4.3.1 Surovina pro přípravu extraktu	32
4.3.2 Příprava primárního extraktu	32
4.3.3 Příprava výtřepku A-Et ₂ O	33
4.3.4 Příprava výtřepku Ad-CHCl ₃	33
4.3.5 Příprava výtřepku Bc-Et ₂ O	33
4.3.6 Příprava výtřepku Bd-CHCl ₃	33
4.3.7 Příprava kvarterních jodidů J	33
4.3.8 Příprava kvarterních alkaloidů Q	33
4.3.9 Zpracování výtřepku A-Et ₂ O (pH 9 – 10)	36
4.3.9.1 Znečištěniny z kyselého roztoku a nebazické alkaloidy	36
4.3.9.2 Chloridy alkaloidů rozp. v CHCl ₃ (AC)	36
4.3.9.3 Chloridy alkaloidů rozp. v CHCl ₃ , nefenolových (AC ₁)	36
4.3.9.4 Chloridy alkaloidů rozp. v CHCl ₃ , fenolových (AC ₂)	36
4.3.9.5 Chloridy alkaloidů nerozp. v CHCl ₃ , báze rozp. v Et ₂ O (AD)	36
4.3.9.6 Chloridy alkaloidů nerozp. v CHCl ₃ , nefenolových (AD ₁)	36
4.3.9.7 Chloridy alkaloidů nerozp. v CHCl ₃ , fenolových (AD ₂)	37
4.3.9.8 Chloridy alkaloidů nerozp. v CHCl ₃ (AD), nerozp. v Et ₂ O (ADd)	37
4.3.10 Sloupcová Chromatografie výtřepku AC ₁	37
4.3.11 Čištění spojených frakcí 72 – 81	39

4.4	Určení struktury izolované látky	41
4.4.1	Měření hmotnostního spektra	41
4.4.2	Měření NMR spektra	41
4.5	Stanovení účinku alkaloidů na erytrocytární AchE (IC ₅₀)	41
4.5.1	Podmínky měření	41
4.5.2	Stanovení anticholinesterasové aktivity	41
4.5.3	Matematické zpracování experimentálních dat	42
5.	VÝSLEDKY	43
5.1	Předběžné určení struktury látky PS – 03	44
5.1.1	Hmotnostní spektroskopie	44
5.1.2	Stanovení na základě fyzikálně chemických charakteristik	44
5.2	Stanovení hodnot IC ₅₀	47
6.	DISKUSE	48
7.	POUŽITÁ LITERATURA	51
8.	ABSTRAKT	55

1. ÚVOD

Neurodegenerativní onemocnění jsou širokou skupinou chorob centrálního a také periferního systému. Jsou způsobena předčasným zánikem nebo degenerací nervových buněk.¹ Neurodegenerativní choroby jsou spojeny s vážnými psychickými a neurologickými příznaky. Projevují se hlavně demencí, objevuje se ztráta paměti, rozumových schopností, poruchy chování, úpadek osobnosti, špatná koordinace pohybu a řeči. Tato onemocnění znamenají velkou zátěž pro pacienty, jejich rodiny a společnost. Demenci charakterizuje jak úbytek kognitivních funkcí, tak úbytek intelektuálních funkcí, projevuje se hlavně v pracovní a sociální výkonnosti pacienta.²

Patofyziologie a příčiny těchto onemocnění jsou zatím málo známy. Možnosti léčení jsou doposud nedostatečné. Prognóza nemoci zůstává špatná. Avšak naději vzbudil výzkum, který se zaměřuje na lepší pochopení genetické a biologické podstaty onemocnění, hledají se tak efektivnější léčebné postupy.³

Do skupiny neurodegenerativních onemocnění patří mimo Alzheimerovu chorobu například Parkinsonova nemoc nebo Huntingtonova nemoc.

Příznakem Parkinsonovy choroby je pohybová chudost, zpomalení, rigidita svalů, třes v klidu a obtížné udržování rovnováhy. Postihuje hlavně nervové buňky mozku produkující neurotransmiter dopamin, látku, která reguluje bazální ganglia. Ganglia se podílejí na regulaci hybnosti a nedostatek dopaminu tak způsobí poruchy pohybu. Při léčbě se používají pouze prostředky, které umožní mírnit průběh nemoci, avšak nemoc nevyléčí.

Huntingtonova choroba je velmi vážné onemocnění, není moc časté, ale je nevyléčitelné a vede ke smrti pacienta. Nemoc je podmíněna geneticky. Podstatou je poškození některých neuronů v mozku. Charakteristické jsou nekoordinované trhavé pohyby těla a snížení mentálních schopností.

Nejzávažnější neurodegenerativní onemocnění je Alzheimerova choroba, onemocnění multifaktoriální, kde dodnes není známá konkrétní příčina. Je progresivním onemocněním CNS, postihuje motorické, senzorické a kognitivní funkce a projevuje se zánikem kortikálních a subkortikálních neuronů. Postupně vede k úmrtí pacienta.⁴

Tím, že neznáme příčinu Alzheimerovy choroby, nemůžeme využívat při léčbě kauzální terapii. Léčba se zaměřuje na zvýšení acetylcholinu v postižených oblastech. Stav nemocného se proto zmírňuje cholinergiky. Ta by měla dobře pronikat do CNS a mít nepatrné nežádoucí účinky. Některé látky vykazují žádoucí cholinomimetické vlastnosti, ale nejsou vhodné pro své nežádoucí účinky. Jako první inhibitor acetylcholinesterasy byl do terapie Alzheimerovy nemoci zaveden takrin, zlepšení stavu bylo však přechodné a pochybné. Dalším byl donepezil nebo inhibitor acetylcholinesterasy rivastigmin.⁴ Z přírodních látek se v současné době využívá

galanthamin, alkaloid z některých rostlin čeledi Amaryllidaceae, nebo huperzin z *Huperzia serrata*. Galanthamin jednak inhibuje enzym acetylcholinesterasu, ale také zesiluje účinky acetylcholinu na nikotinových receptorech.⁵ Huperzin vykazuje inhibiční aktivitu a kognitivní efekt.⁶ K účinkům všech těchto látek je důležité, že příznivý efekt se někdy nedostaví vůbec nebo je velmi slabý a po několika týdnech odezní, progresi choroby vůbec nezadrží. Účinky se pozorují jen v lehkých stádiích choroby.

Proto je nutný další výzkum a hledání látek, které by nemoc zpomalily. Výzkum Alzheimerovy choroby je ve světě řazen mezi priority. Především jsou zkoumány mechanismy neurodegenerace a možnosti jejího ovlivnění. Naděje jsou vkládány do použití kmenových buněk, nebo imunizace proti beta-amyloidu.⁷ Probíhá výzkum látek syntetických, ale také přírodních. Z přírodních látek jsou sledovány hlavně alkaloidy, které mohou vykazovat inhibiční účinek na acetylcholinesterasu a tím přispívat při léčbě Alzheimerovy choroby. Alkaloidy představují rozsáhlou skupinu chemických sloučenin. Mají vysoký fyziologický účinek, proto se používají i jako léčiva.⁸ Výzkum probíhá právě v oblasti hledání alkaloidních látek a jednou ze skupin, které by mohly poskytnout perspektivní cesty, je i čeleď Papaveraceae.

2. CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo:

1. Podílet se na extrakci 30 kg suché makoviny 95% ethanolem, zahuštění a předčištění primárního extraktu.
2. Podílet se na přípravě jednotlivých typů výtřepku z tohoto primárního extraktu (diethyletherového při pH 10, chloroformového při pH 10, stejné výtřepky pH 12 – 13) prováděné školitelem.
3. Rozdělení diethyletherového výtřepku získaného při pH 10 na chloridy, které jsou v chloroformu rozpustné a nerozpustné, každý z obou podílů dále rozdělit na fáze fenolové a nefenolové.
4. Výtřepky obsahující alkaloidy, jejichž chloridy jsou rozpustné v chloroformu a jsou nefenolové rozdělit preparativně na sloupci oxidu hlinitého.
5. Provést preparativní TLC a dalším procesem čištění získat jeden alkaloid v čistém stavu.
6. Po zjištění molekulové hmotnosti (mimo rámec diplomové práce) se podílet na stanovení anticholinesterasové aktivity (acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa za použití lidských erytrocytárních pouzder a plasmy).

Při práci v laboratoři jsem spolupracovala s Tamarou Rosikovou a Ivanou Filákovou.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 ALZHEIMEROVA CHOROBA

3.1.1 Charakteristika demence

Slovo demence je odvozeno od latinského slova de mens, označuje pokles úrovně duševní činnosti. Pojem demence se vyvíjí asi 150 let.⁹

Syndrom demence je porucha, kdy dochází ke snížení úrovně paměti, poznávacích funkcí, patří zde i snížení pozornosti, snížení vnímání a řečové funkce. K těmto postižením dochází onemocněním mozku. Důležité je, že u syndromu demence není kvalitativní úroveň vědomí zastřena. K dalším postižením patří zhoršení aktivit denního života, poruchy emocí. Vše vede k tomu, že se nemocný stává nesoběstačným. Ke vzniku demence nevede jen Alzheimerova choroba, ale dalších 60 chorob.⁷

Podle příčiny je možné demence dělit do tří skupin:

1. Atroficko-degenerativní demence, které vedou ke snížení počtu nervových buněk, snížení synapsí, k ukládání patologických bílkovin. K tomuto typu patří i Alzheimerova choroba nebo demence při Parkinsonově chorobě.
2. Vaskulární demence, u nichž dochází k poškození mozkové tkáně cévními poruchami. Patří zde multiinfarktová demence nebo Binswangerova demence.
3. Třetí skupinou jsou ostatní symptomatické demence. Vznikají na podkladě celkových onemocnění organismu. Může se tak stát při intoxikaci, zánětech, nádorech mozku. Zde se řadí například demence infekční, metabolické, traumatické etiologie.⁷

3.1.2 Historie vzniku Alzheimerovy choroby

Vývoj Alzheimerovy choroby byl dlouhý, složitý a stále pokračuje. V roce 1907 řešil Alois Alzheimer, mnichovský neuropatolog, případ ženy, u které se objevily příznaky demence. Tato žena zemřela po čtyřletém průběhu nemoci ve věku 51 let. Při pitvě se objevily na mozku atrofie a mikroskopické léze nazývané neurofibrilární klubka. Tento nález byl odlišný od běžné senilní demence, proto Kraepelin nemoc pojmenoval v roce 1910 podle Alzheimerova.²

3.1.3 Charakteristika Alzheimerovy choroby

Alzheimerova choroba je v posledních letech nejčastěji studovanou degenerativní chorobou mozku. Postihuje stále více lidí a šíří se jako tichá epidemie.¹² Toto neurodegenerativní onemocnění vede k úbytku populací nervových buněk a k mozkové atrofii. Následkem je vznik syndromu demence. Alzheimerova choroba je nejčastější příčinou demence v populaci lidí

starších 55 let. Zodpovídá za 50 % všech případů demencí. Je také čtvrtou nejčastější příčinou smrti. Incidence a prevalence Alzheimerovy choroby koreluje s věkem, její četnost s věkem stoupá, od 65 let věku činí 5 %, ve skupině 80-letých postihuje 40 % lidí. Zkracuje průměrnou délku života. Bývá nazývaná chorobou stáří, je ale pravdou, že byly popsány i případy, kdy nemoc propukla ve 35 roce a také se objevil případ nemoci ve věku 15 let.²

Tato choroba se projevuje jako raná forma nazývaná presenilní Alzheimerova nemoc nebo pozdní forma, senilní demence Alzheimerova typu. Raná forma začíná do 65 let a trvá 6 – 8 let, přičemž pozdní forma propukne ve věku nad 65 let a trvá déle než 10 let. Obě formy nemoci se mohou vyskytovat s vyšší četností v některých rodinách, vykazují tak familiární agregaci. Předpokládá se, že familiární typ Alzheimerovy choroby je podmíněn vlivy genetickými a vlivy zevního prostředí.¹⁰

U nemocných trpících Alzheimerovou chorobou dochází k makroskopické mozkové atrofii a objevují se mikroskopické nálezy. Mezi makroskopicky patrné změny patří zúžení mozkových závitů, dilatace a atrofie některých mozkových komor.¹¹ Numerická redukce neuronů převyšuje normální stárnutí o 40 % – 80 %, nachází se nejvíce v oblasti spánkových laloků, čelních laloků a gyrus cinguli, také je postižena oblast hippocampu, vyskytuje se redukce počtu neuronů v dopaminergní substantia nigra a v noradrenergním locus coeruleus předního mozku.²

Dochází k postižení acetylcholinergní aktivity. Acetylcholin po svém uvolnění přenáší vzruch na další nervová vlákna. Objevuje se postižení presynaptické oblasti. Je snížena aktivita cholinacetyltransferasy, enzymu syntetizujícího acetylcholin, snižuje se vstup prekursorů cholinu a acetyl-koenzymu A. Taktéž se snižuje uvolňování acetylcholinu z presynaptického zakončení a jeho zpětné vychytávání. Dále klesá syntéza dopaminu a stoupá jeho inaktivace monoaminoxidázou.⁵

V mozkové tkáni nemocných dochází v prostorech mimo nervové buňky k ukládání bílkoviny beta-amyloidu. Beta-amyloid se řadí mezi proteinové klastry. Je to mezibuněčný protein tvořící plaky, které mají tu schopnost, že likvidují mitochondrie okolních buněk a navíc znemožňují buněčnou regulaci. Je to polypeptid o 39 – 43 AMK.³⁶ Vzniká z bílkoviny přítomné v mozkových buňkách, ta je za patologických podmínek štěpena enzymy beta- a gama-sekretázami, tak se vytváří delší fragmenty, které polymerizují. Beta-amyloid tvoří krystalky a útvary, nazývané senilní plaky. Histologicky je možno rozlišit osm typů senilních plak podle přítomnosti a druhu degenerace neuritů. Ukládání beta-amyloidu do plaků je jedním ze dvou charakteristických rysů Alzheimerovy choroby. Senilní plaky, koncentrované v prostorech mezi nervovými buňkami v mozkovém parenchymu a stěnami mozkových cév, brání neuronům

vykonávat jejich funkci a podporují neuronovou degeneraci. Podle nových teorií je etiologie Alzheimerovy choroby vysvětlována amyloidní kaskádovou hypotézou, kdy nadprodukce beta-amyloidu vede k hromadění amyloidních depozit a přispívá k tvorbě neurofibrilárních klubiček. Léze jsou spojeny s neuronovou buněčnou smrtí, která vede ke ztrátě paměti. Kromě tvorby patologických bílkovin dochází k řadě dalších degenerativních změn. Všechny patologické změny jsou na sobě závislé a vzájemně spřažené.^{2,9}

Diagnostikovat Alzheimerovu chorobu je složitým problémem hlavně na počátku nemoci, rodina a nemocní hodnotí některé příznaky této choroby jako projevy běžného stárnutí. Vědecké důkazy však jasně ukazují, že pouze časná diagnóza a cílená terapie může prodloužit samostatnost nemocných. Na této diagnostice se účastní jednak pacient a pečující osoba, dále je důležité vyšetření somatické (například TK, pulz, EKG, laboratorní vyšetření krevního obrazu, kyseliny listové, vyšetření krevních minerálů, kreatininu, jaterní testy, EEG, neurologické vyšetření). Taktéž se dělá orientační vyšetření poznávacích funkcí, provádějí se různé testy paměti a v neposlední řadě i různé zobrazovací techniky (například magnetická rezonance mozku, CT mozku, EEG). Definitivní diagnóza Alzheimerovy nemoci je pouze histologická z biopsie nebo autopsie. Kritéria stanovení jsou dosti složitá a jsou náplní patologů.⁷

3.1.4 Terapie Alzheimerovy choroby

Vzhledem k tomu, že dosud není zcela známa etiopatogeneze Alzheimerovy nemoci, není možné používat kauzální terapii. Terapie Alzheimerovy nemoci má být komplexní, zahrnuje farmakoterapii, psychosocioterapii, léčbu interkurentních onemocnění, rehabilitaci tělesných funkcí a práci s rodinou a pečovateli.

Farmakoterapie Alzheimerovy nemoci lze rozdělit do dvou skupin:

- a) kognitivní farmakoterapie
- b) nekognitivní, symptomatická farmakoterapie¹⁰

Kognitivní terapie má blíže ke kauzální léčbě. Používá se zde celá řada terapeutických strategií, zaměřených na ovlivnění různých patogenetických řetězců demencí.⁷

Nekognitivní farmakoterapie ovlivňuje různé nekognitivní symptomy Alzheimerovy choroby, jako jsou například poruchy spánku, depresivní nebo úzkostné stavy, stavy neklidu. Dělení na kognitivní a nekognitivní farmakoterapii není striktní, někdy můžeme zlepšením nekognitivních funkcí příznivě ovlivnit funkce kognitivní.⁹

Pro průběh nemoci je charakteristické narušení cholinergní transmise. Souvisí s nedostatkem mozkového acetylcholinu, který zajišťuje přenos informací mezi mozkovými buňkami. Úbytek neuronů a porucha přenosu informací mezi nimi pak vede k narušení

mozkových funkcí. Na této cholinergní hypotéze je založena současná terapie Alzheimerovy choroby. Spočívá hlavně v podání centrálně účinných inhibitorů acetylcholinesterasy.¹²

Inhibitory mozkových acetylcholinesteras jsou jedním z farmakologických postupů léčby založených na důkazech, to znamená na výsledcích rozsáhlých multicentrických randomizovaných dvojitě slepých studiích.¹³ Tyto dvojitě zaslepené, placebem kontrolované studie s inhibitory cholinesteras ukázaly, že podání těchto látek vede ke zpomalení průběhu demence. Další léčebný postup, který je založen na důkazech, je použití memantinu.¹⁴

3.1.4.1 Kognitivní farmakoterapie

1. Inhibitory mozkových acetylcholinesteras

Tyto látky zablokuje nadměrné odbourávání acetylcholinu, udržují déle molekuly acetylcholinu ve stavu, kdy jsou schopné navázat se na své presynaptické i postsynaptické receptory. Některé inhibují pouze acetylcholinesterasu, jiné i butyrylcholinesterasu. Je od nich očekáváno, že budou dobře procházet hematoencefalickou membránou, aby inhibovaly pouze mozkové formy acetylcholinesteras.¹⁵

Z inhibitorů cholinesteras jsou nyní používány tři látky: donepezil, rivastigmin, galanthamin. Akridinový přípravek takrin byl stažen pro hepatotoxicitu. V indikaci Alzheimerovy nemoci se používají také alkaloidy například huperzin nebo galanthamin. Huperzin je alkaloid z *Huperzia serrata*, jeví se jako perspektivní látka. Galanthamin je alkaloid z některých rostlin čeledi Amaryllidaceae. Působí na acetylcholinergní systém, provádí jednak reverzibilní inhibici acetylcholinesterasy a rovněž alostericky moduluje nikotinové receptory.¹⁵

2. Látky zlepšující narušenou glutamátergí transmissi

S postupující progresí Alzheimerovy choroby dochází k poškození mozkového systému excitačních aminokyselin. Pro paměť je důležitá správná funkce tohoto systému, kdy ionotropní receptor typu NMDA zprostředkovává v součinnosti s kainátovým receptorem mechanismus dlouhodobé potenciace. U demencí Alzheimerovy nemoci dochází k nadměrnému uvolňování molekul glutamátu a dalších excitačních kyselin. Na receptorové úrovni se znemožní přenos správných signálů a je narušena dlouhodobá potenciace. Terapeuticky užitečné jsou parciální inhibitory NMDA receptorů.³⁸ V praxi je zatím jediná látka této skupiny, memantin. Je používán hlavně u středně těžkých nebo těžkých demencí.^{16,37}

3. Prekurzory tvorby acetylcholinu

Podání samotného acetylcholinu není možné, protože acetylcholin má velmi krátký poločas. Používají se lecitiny, z nichž se postupně uvolňuje cholin pro syntézu acetylcholinu. Používá se sójový lecitin jako součást kombinované farmakoterapie nejčastěji s inhibitory acetylcholinesteras.¹⁰

4. Látky likvidující reaktivní formy kyslíku nebo snižující jejich tvorbu

Za fyziologických okolností jsou tvorba a odbourávání volných kyslíkových radikálů v rovnováze. U Alzheimerovy choroby může tvorba reaktivních forem kyslíku převýšit jejich odbourávání. Můžou poté působit peroxidaci lipidů, inaktivovat některé enzymy. Zametače volných kyslíkových radikálů se používají častěji jako aditivní terapie k inhibitorům acetylcholinesteras nebo k memantinu. Nejčastěji se používá vitamín E.¹⁴

5. Nootropní farmaka

U těchto látek nebyl prokázán dostatečný účinek, přesto mohou být některé z nich užitečné jako přídatná léčiva. Používán je nicergolin a extrakt z *Ginkgo biloba*, který obsahuje větší počet látek působících různými mechanismy.¹⁴

3.1.4.2 Nekognitivní farmakoterapie

1. Farmakoterapie poruch spánku

U Alzheimerovy choroby se může vyskytovat jako přidružený příznak nespavost, častěji se vyskytuje posun cyklu spánek-bdění, může dojít k dennímu pospávání, nočnímu bdění. Někdy se naopak může objevit hypersomie.

Farmaka se vybírají s ohledem na jejich nežádoucí účinky. Barbituráty jsou proto spíše obsoletní. Benzodiazepiny mají kromě hypnotického účinku také účinek protiúzkostný, antiepileptický, myorelaxační. Vzhledem k jejich nežádoucím účinkům by mělo být použití benzodiazepinů u Alzheimerovy nemoci výjimečné a krátkodobé. Někdy se při léčbě používá midazolam, triazolam nebo nitrazepam. S nižšími nežádoucími účinky se používají nová nebenzodiazepinová hypnotika jako je například zolpidem nebo zopiklon.¹⁰

2. Farmakoterapie poruch chování, paranoidních a halucinatorních syndromů

Poruchy chování při Alzheimerově chorobě jsou označovány jako agitovanost. Agitovanost může být různého stupně, je spojena s excitovaností, verbální a brachiální agresivitou. Často se vyskytují poruchy vnímání, halucinace, iluze a poruchy myšlení neboli bludy. Základní skupinou farmak jsou neuroleptika.⁹

3. Farmakoterapie přidružené deprese

Deprese je poměrně častý přidružený příznak Alzheimerovy choroby. U výraznější deprese se musí užít antidepresiva. Tyto léky zvyšují obsah serotoninu a noradrenalinu na synaptické štěrbině. Vyhýbáme se antidepresivům s výraznými vedlejšími účinky.⁹

3.1.5 Enzym acetylcholinesterasa a butyrylcholinesterasa

Acetylcholin je neurotransmiterem ve vegetativních gangliích, na zakončení pregangliových vláken v dřeni nadledvin, na zakončení postgangliových vláken parasymptiku, na neuromuskulárním spojení v kosterním svalstvu a v oblastech CNS.

Acetylcholin je tvořen v cytoplasmě neuronů z cholinu. Syntetizovaný acetylcholin je uskládán v zásobních vezikulách. Uvolňování nastává na základě akčního potenciálu, který umožní vstup vápníkových iontů do cytoplasmy. Rozkládán je v synaptické štěrbině enzymem acetylcholinesterasou na cholin a acétát.¹⁷ Kladně nabitý dusík substrátu acetylcholinu interaguje s anionickým centrem enzymu, na štěpení esteru se podílí esterické centrum, jehož hydroxylová skupina přebírá kovalentní vazbou acetylovou skupinu acetylcholinu, acetylace esterasy však přetrvává pouze milisekundy. U organofosfátů, které přenášejí fosfátový zbytek na hydroxylovou skupinu serinu, může fosforylace enzymu přetrvávat i dny.⁴

U pacientů s Alzheimerovou chorobou je demence důsledkem snížení hladiny acetylcholinu v mozkové kůře. Ve zdravé mozkové tkáni je acetylcholinesterasa nejdůležitější enzym regulace hladiny acetylcholinu.

Inhibice acetylcholinesterasy je podkladem nepřímo působících cholinomimetik, inhibice ať už reversibilní nebo ireversibilní vede k nahromadění acetylcholinu na muskarinových a nikotinových receptorech a tím k jejich stimulaci.¹⁷

Butyrylcholinesterasa (pseudocholinesterasa) je substrátově méně specifický enzym, který přednostně rozkládá jiné substráty než acetylcholin (např. butyrylcholin, prokain, suxamethonium). Je přítomna např. v plazmě, játrech a pouze v omezeném rozsahu v neuronech periferního a centrálního nervového systému.

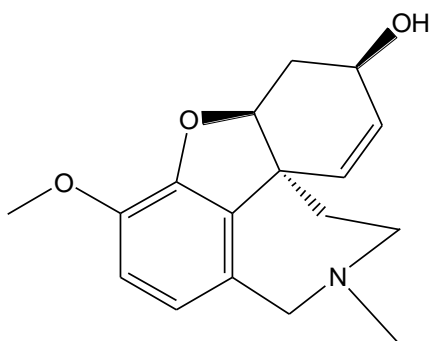
Během Alzheimerovy choroby klesá v mozku množství AChE a stoupá množství BuChE, která je tvořena aktivovanými gliovými buňkami v oblasti alzheimerovských plaků.

3.2 PŘÍRODNÍ LÁTKY PERSPEKTIVNÍ PRO LÉČBU ALZHEIMEROVY NEMOCI

V terapii demencí Alzheimerova typu se uplatňují některé přírodní látky, v současné době se z přírodních látek využívá pouze galanthamin, ale existují i další perspektivní přírodní látky, které by se při léčbě daly použít. Z přírodních látek jsou sledovány hlavně alkaloidy, přičemž se v současnosti rozšiřuje výzkum i na látky nealkaloidní. Mechanismem účinku mohou ovlivňovat osud acetylcholinu, buď ho přímo uvolňovat nebo inhibovat acetylcholinesterasu, působit ovlivněním senilních plaků nebo mohou mít antioxidační účinek.⁶

3.2.1 Inhibitory acetylcholinesterasy

Tyto přírodní inhibitory mají často komplexní účinek, některé zasahují i do metabolismu butyrylcholinesterasy a různě inhibují acetylcholinesterasu. Mezi nejznámější a nejaktivnější inhibitory patří galanthamin, isochinolinový alkaloid používaný na celém světě při léčbě senilní demence typu Alzheimerovy choroby.³⁴ Galanthamin provádí reverzibilní inhibici acetylcholinesterasy a rovněž alostericky moduluje nikotinové receptory. Má však určité nežádoucí periferní cholinergní účinky, výrazně lepší účinky mají některé jeho deriváty, snižuje se u nich nauzea. Mezi deriváty patří karbamáty 6-demethylgalanthaminu, které jsou účinnější v inhibici než galanthamin nebo estery 6-demethylgalanthaminu, u nichž se snižují periferní účinky. Nižší aktivitu mají alkaloidy lykorinového typu například assoanin.⁶



galanthamin

Dalším perspektivním dlouhodobě působícím inhibitorem acetylcholinesterasy je huperzin. Je zkoušen hlavně v Číně. V USA je převážně používán jako potravní doplněk. Má neuroprotektivní aktivitu s výrazným efektem na zlepšení paměti.³⁵

Zástupcem pregnanových steroidních alkaloidů je salignenamid C z *Sarcococca saligna*, čeledi Buxaceae, který výrazněji zasahuje do účinku enzymu butyrylcholinesterasy.⁶

Zeatin izolovaný z podzemní části rostliny *Fiatoua villosa*, čeledi Orchidaceae nebo z květenství *Zea mays*, čeledi Poaceae vedle inhibiční aktivity blokuje tvorbu beta-amyloidu.⁶

Vysoký inhibiční účinek má také ursolová kyselina izolovaná z různých rodů čeledi Lamiaceae (*Majorana hortensis*, *Rosmarinus officinalis* nebo *Salvia officinalis*).⁶

Perspektivní je rovněž extrakt tenuigenin z rostliny *Polygala tenuifolia*, čeledi Polygalaceae, má velmi nízkou toxicitu, neuroprotektivní efekt a zabraňuje smrti neuronálních buněk, inhibuje i tvorbu beta-amyloidu. Tenuigenin rovněž inhibuje aktivitu acetylcholinesterasy. Tento extrakt je strukturně blízký kyselině oleanolové.⁶

Mezi další zajímavé možné inhibitory enzymu acetylcholinesterasy můžeme zařadit např. dehydroevodiamin, α -onocerin nebo α -viniferin. Dehydroevodiamin je izolován z rostliny *Evodia rutaecarpa*, čeledi Rutaceae, který má mimo jiné i anti-amnestický efekt. V působení je silnější než takrin, α -onocerin obsahuje rostlina *Ononis spinosa*, čeledi Fabaceae, α -viniferin, jehož aktivita je specifická, reversibilní a nekompetitivní, můžeme získat z rostliny *Caragana chamlague* z čeledi Fabaceae.⁶

3.2.2 Uvolňovače acetylcholinu

Bylo zjištěno, že příznivý efekt na acetylcholin nastává při stimulaci nikotinových receptorů, stimulanty jsou kodein, galanthamin a některé analogy arekolinu. Mezi M_2 antagonisty muskarinu se řadí himbacin obsažený v rostlině *Galbulimima baccata* z čeledi Himantandraceae.⁶

3.2.3 Látky s antioxidačním účinkem

Antioxidační účinek má ginkgolid B (*Ginkgo biloba*, Gingoaceae). V současnosti je možná i jeho reálná totální syntéza, účinek se projevuje v ochraně neuronů při mozkové hypoxii, taktéž snižuje viskozitu krve.^{6,14}

3.2.4 Látky ovlivňující produkci a toxicitu beta-amyloidu

Tashinon I (*Salvia miltiorrhiza*, Lamiaceae)⁶, alkaloidy z *Artemisia asiatica* (Asteraceae) kromě inhibice AChE navíc blokují neurotoxické působení beta-amyloidu.¹⁸

3.2.5 Inhibitory propylendopeptidasy

PEP je široce rozšířená v různých tkáních, také v lidském mozku, kde hydrolyzuje neuropeptidy s obsahem prolinu, které participují na učení a paměťových procesech. Zvýšená hladina je pozorována u neurodegenerativních chorob jako výrazná deprese, mánie, demence Alzheimerova typu. Patrně je zodpovědná za metabolismus C-terminální části amyloidního prekurzorového proteinu, zodpovědného za degeneraci neuronů a také navozuje imunoreaktivitu zodpovědnou za procesy rychlejšího stárnutí mozku. Inhibitory PEP mají anti-amnestický efekt. Řadí se k nim fenantrenové deriváty (*Salvia deserta*, Lamiaceae).⁶

3.3 *Papaver somniferum* L.



Obr. 1 *Papaver somniferum* L.³⁹

3.3.1 Synonyma

Papaver album Mill., *Papaver hortense* Garsault, *Papaver officinale* C. C. Gmel¹⁹

3.3.2 Systematické zařazení *Papaver somniferum* L.²⁰

Říše	<i>Plantae</i>	rostliny
Podříše	<i>Cormobionta</i>	vyšší rostliny
Oddělení	<i>Magnoliophyta</i>	krytosemenné
Třída	<i>Rosopsida</i>	vyšší dvouděložné
Řád	<i>Papaverales</i>	makotvaré
Čeleď	<i>Papaveraceae</i>	makovité
Rod	<i>Papaver</i>	mák

3.3.3 Botanický popis

3.3.3.1 Popis čeledi

K čeledi mákovité (Papaveraceae) se řadí rostliny jednoleté, dvouleté nebo vytrvalé, mohou to být však i nízké stromy nebo keře. Kanálky v pletivech obsahují bílý, žlutý nebo červený latex. Listy jsou řapíkaté se střídavým postavením, někdy mají postavení vstřícné nebo šroubovitě. Květy jsou pravidelné, oboupohlavné, obsahují vysoký počet tyčinek. Semeník je svrchní. Kalich je tvořen dvěma nebo třemi kališními lístky. Korunu tvoří 2 + 2 plátky.

Plodem čeledi mákovité jsou tobolky. Semena obsahují olejnaté látky. Čeleď Papaveraceae je příbuzná s čeledí Fumariaceae, která ale ve svých pletivech neobsahuje mléčnice.

Čeleď mákovité je rozšířena kosmopolitně, hlavně v mírném a subtropickém pásu, zahrnuje asi 20 rodů se 400 druhy. V České republice rostou 4 rody asi s 16 druhy. Využívány jsou pro obsah alkaloidů, hlavně v lékařství.^{20,21}

3.3.3.2 Popis rostliny

Rod *Papaver* z čeledi Papaveraceae zahrnuje 110 druhů. Do rodu mák jsou řazeny jednoleté, dvouleté nebo vytrvalé rostliny, obsahující v pletivech mimo semena mléčnice s bílým latexem. Mají velké květy, mnoho tyčinek a pestík bez čnělky. Semeník je uvnitř neúplně přehrádkován. Zralá makovice se otevírá drobnými otvory a obsahuje velký počet semen.^{19,21}

Nejvýznamnějším je druh *Papaver somniferum*. Mák setý je jednoletá bylina se zdužnatělým kulovitým kořenem a velkým množstvím malých kořínků. Rostlina je modře ojíňená, vysoká 30 – 180 cm, lodyha je zpravidla jen jedna, přímá, jednoduchá a oblá, někdy bývá i větvená. Listy jsou podlouhlé, dolní celistvé, horní zubaté. Květ má dva opadavé kališní lístky, čtyři korunní lístky, které jsou bílé, růžové nebo fialové s tmavší skvrnou. Plodem je tobolka různé velikosti a tvaru kuželovitého, kulovitého nebo zploštělého. Na přehrádkách bývá množství drobných ledvinovitých semen. Semena obsahují v sušině oleje, bílkoviny, sacharidy, vlákninu a minerální látky. Mák setý kvete od června do srpna.^{20,22}

3.3.4 Ekologie

Mák setý nemá zvláštní požadavky na prostředí a u nás se dá pěstovat hlavně v řepářském a bramborářském výrobním typu. Přesto však velmi citlivě reaguje na nevyrovnanost a odchylky v půdě, výživě a na povětrnostní podmínky. Najdeme ho na zemině bohaté na živiny, mírně dusíkaté, zásobené základními prvky zvláště draslíkem a fosforem, nevyskytuje se na zemích příliš suchých a sprašových.^{20,23}

3.3.5 Celkové rozšíření

V současné době mák setý roste planě v celém středomoří, ale hlavně v Malé Asii. Pěstuje se téměř po celém světě. Mák můžeme rozdělit na dva typy: olejný a opiový. Mezi nejvýznamnější pěstitele máku opiového se řadí Turecko, Indie, Pákistán, Makedonie. Nejznámější oblastí je však tzv. Zlatý trojúhelník, zahrnující horské oblasti Barmy, Thajska a Laosu. Menší pěstitelskou oblastí je tzv. Zlatý pŕlměsíc, který zahrnuje hlavně Írán, Afghánistán a Pákistán.^{20,23}

V České republice je pěstování máku na ploše větší než 100 m² dle zákona č. 167/1998 spojeno s ohlašovací povinností.^{25,39}

3.3.6 Obsahové látky *Papaver somniferum* L.

Hlavní obsahové látky máku setého v makovině a nati jsou alkaloidy, celkový obsah alkaloidů je kolísavý, ovlivňuje ho doba sklizně, umístění, genetické a jiné faktory.

Semena máku obsahují 42 – 55 % polovysychavého oleje obsahujícího kyselinu palmitovou, stearovou, olejovou a linolenovou, vedle tuku je v semeni 18 – 25 % dusíkatých látek, 16 – 24 % sacharidů, celulóza, lecitin, anorganické látky a voda.

Celá rostlina je prostoupena mléčnicemi s bílou emulzí – latexem, který obsahuje bílkoviny, cukry, slizy, vosky, pryskyřice, různé alkaloidy a některé kyseliny, hlavně mekonovou.^{23,27}

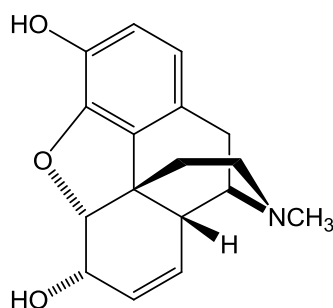
Z máku se rovněž získává opium, velmi bohaté na obsah alkaloidů.

Alkaloidy (např. morfin, narkotin, kodein, papaverin, tebain, narcein) se získávají hlavně z tobolek a ze stonku v části 7 – 10 cm pod tobolekou. Maximální koncentrace alkaloidů v nadzemních částech je od vývinu poupat do technické zralosti. Největší množství alkaloidů je v rostlinách po poledni. Hlavními alkaloidy jsou typu morfinu a benzylisochinolinu, místem syntézy jsou pletiva matabolicky aktivní např. meristémy.²³

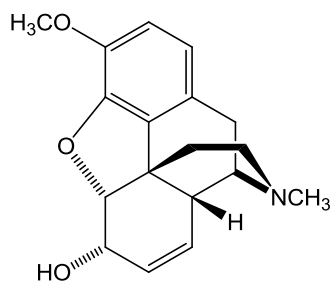
3.3.6.1 Rozdělení alkaloidů

V droze se vyskytují alkaloidy různých strukturních typů, mnoho alkaloidů obsahuje opium, kde jsou nejvýznamnější alkaloidy

- 1) morfinanového typu – morfin, pseudomorfin, kodein, neopin, 10-hydroxykodein, thebain^{20,26}

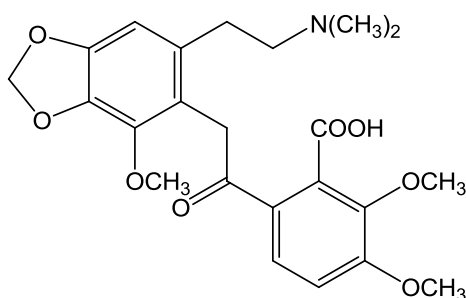


morfin



kodein

- 2) benzyloisochinolinového typu – papaverin, papaveraldin, palaudin, laudanin, laudanidin, laudanisin, kodamin^{20,26}
- 3) ftalidisochinolinového typu – narkotin, narkotolin, gnoskopin, oxynarkotin, narcein^{20,26}



narcein

- 4) tetrahydroisochinolinového typu – hydrokotanin²⁰
- 5) protopinového typu – protopin, kryptopin²⁰
- 6) protoberberinového typu – skoulerin, isokorypalmin²⁰
- 7) aporfinového typu – korytuberin, magnoflorin, isoboldin, papaverrubin, porfyroxin, glaudin²⁰

Procentuální zastoupení alkaloidů se velmi liší a závisí na mnoha faktorech, hlavním alkaloidem je morfin a kodein, jejichž procentuální zastoupení se pohybuje od 0,2 až 3 % průměrné zastoupení je však 1 %, thebain 0,2 až 1 %, průměrně 0,5 %, noskapin od 2 do 10 %, průměrně 5 %, papaverin 0,5 až 1,3 %, průměrně 1 %, narcein 0,1 – 0,7 %, průměrně 0,5 %, procentové zastoupení alkaloidů laudaninu, laudanosinu a laudanidinu je méně než 0,01 %, pseudomorfinu 0,02 %, ještě v menším množství je obsažen například mekonidin, kryptopin, neopin, oxynarkotin, kdy obsah činí do 0,002 %. ²⁰

3.3.7 Farmakologické účinky obsahových látek

Farmakologické účinky rostliny mají především alkaloidy. Alkaloidy z čeledi Papaveraceae, Amaryllidaceae a Fumariaceae byly studovány s ohledem na inhibiční aktivitu vůči acetylcholinesterase. Alkaloidy z čeledi Papaveraceae vykazovaly menší inhibiční aktivitu.³² Kinetická analýza poté prokázala, že některé papaverinové alkaloidy působí jako reverzibilní kompetitivní inhibitory acetylcholinesterasy, přičemž papaverin způsobí 85% inaktivaci po 40 minutách.³³

Mezi nejznámější alkaloidy patří morfin, který svou strukturou imituje tělu vlastní látky natolik, že dokáže vstoupit do interakcí s receptory, na které se vážou za normálních okolností tyto látky tělu vlastní. Hlavní účinek morfinu představuje jeho silné analgetické působení vyvolané inhibicí vedení bolestivého impulsu a změnou jeho zpracování v CNS. Tento účinek je dán především interakcí morfinu s opiodními receptory v rozdílných oblastech CNS, hlavní lokalizace je na thalamu a limbickém systému. Terapeutické dávky morfinu mívají ve většině případů hypnotický účinek a snižují duševní aktivitu pacientů. Vyšší dávky vyvolávají narkotické stavy se ztrátou vědomí. Kromě inhibičních účinků má morfin také dráždivé účinky na centrální nervový systém, může vyvolat podráždění centra pro zvracení. Mezi periferní účinky morfinu patří zvýšení tonu hladké svaloviny. Morfin výrazně neovlivňuje tonus a kontrakce uteru v průběhu porodu, kardiovaskulární systém morfin taktéž výrazně neovlivňuje, někdy se však mohou vyskytnout ortostatické potíže. Hlavními příznaky akutní intoxikace jsou kóma, deprese dechu a mióza.^{4,20}

Kodein, alkaloid morfinanového typu, má analgetický účinek ve srovnání s morfinem nepatrný. Používá se jako antitusikum působením na prodlouženou míchu. U člověka má velmi nízký návykový potenciál, naopak u zvířat v běžných dávkách způsobuje závislost.^{20,28}

Mezi alkaloidy benzylochinolinového typu se řadí papaverin, klasické muskulotropní spasmolytikum, které se pro nedostatečnou specifitu účinku již nepoužívá. Má vazodilatační účinky díky přímému působení na hladkou svalovinu, inhibuje fosfodiesterasu a tím zvyšuje cAMP.^{4,20}

Narkotin (noskabin) má dobrý antitusický účinek, neovlivňuje funkci střeva ani dechové centrum. Kromě antitusického účinku nemá jiné centrální efekty, nepůsobí sedativně, nevyvolává závislost.⁴ V ojedinělých případech může mít částečně hypnotický účinek, u žab vyvolal tetanické křeče. Narkotin by mohl zesílit narkotické účinky morfinu, příznivě ovlivňovat dýchání a tím snížit nežádoucí účinek morfinu. Také působení kodeinu jako léku na kašel může být umocněno narkotinem. Periferně se narkotin chová jako papaverin, avšak s malým účinkem a svaly prakticky neovlivňuje.²⁰

Narcein, alkaloid podobný narkotinu, rovněž ftalidisochinolinového typu, je mírné sedativum a hypnotikum.²⁸

Protopinové alkaloidy, např. protopin, kryptopin, jsou nejrozšířenější alkaloidy v rostlinách, zejména v čeledi makovitých.²⁹ V poslední době je zvýšený zájem o protopin z hlediska farmakologie pro jeho příznivé účinky na kardiovaskulární systém³⁰ a také antitrombotickou aktivitu.³¹

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 VŠEOBECNÉ POSTUPY

4.1.1 Destilace o odpařování

Rozpouštědla byla před použitím destilována, nejprve byl zachycen předek (asi 5 %; většinou s vodným azeotropem), poté bylo vydestilováno zbylých 90 % rozpouštědla. Rozpouštědla byla uchovávána v hnědých nádobkách.

Odpařování chromatografických frakcí bylo prováděno na vakuové odparce při 40 °C za sníženého tlaku.

4.1.2 Chromatografie

4.1.2.1 Tenkovrstvá chromatografie

Chromatografie na tenké vrstvě byla použita v systému N (normálních) komor. Komory byly použity nasycené mobilní fází. V případě užití malých komor (válcových), průměr 10 cm, trvalo syčení asi 30 minut. U klasických komor (18x18 cm) pak asi hodinu. Chromatografie byla prováděna vzestupně.

4.1.2.2 Sloupcová chromatografie

Sloupcová chromatografie byla prováděna systémem gradientové eluce na neutrálním oxidu hlinitém, 0,1 – 0,25 mm, deaktivovaném 5 % vody. Sloupec byl plněn obvyklým způsobem – nalitím suspenze adsorbentu do rozpouštědla. Vzorek byl po vysušení v exsikátoru nanesen na roztěru s malým množstvím silikagelu.

4.2 MATERIÁL A VYBAVENÍ

4.2.1 Rozpouštědla a chemikálie

Rozpouštědla:

Cyklohexan, č. (C_6H_{12})

Diethylamin, č. (Et_2NH)

Diethylether, č. bez stabilizátoru (Et_2O)

Ethanol 95%, denaturovaný methanolem, č. ($EtOH$)

Chloroform, č. ($CHCl_3$)

Methanol, č. ($MeOH$)

Toluen, č. ($C_6H_5CH_3$)

Chemikálie:

Dusičnan bismutitý zásaditý, č.

Hydroxid sodný, č.

Jodid draselný, p. a.

Kyanid draselný, č.

Kyselina octová 99%, p. a. (AcOH)

Kyselina sírová 96%, p.a. (H₂SO₄)

Kyselina vinná, č.

Uhličitan sodný bezvodý, č.

Vodný roztok chlorovodíku 36%, p. a. (HCl)

4.2.2 Chemikálie a materiál ke stanovení účinku erytrocytární AChE (IC₅₀)

Chemikálie:

10 mM acetylcholinjodid (Sigma-Alcrich)

10 mM butyrylcholinjodid (Sigma-Aldrich)

0,1 M fosfátový pufr pH 7,4

5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová)kyselina (DTND) (Sigma-aldrich)

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, p. a. (Lachema)

Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát, p. a. (Lachema)

Eserin (Sigma-Aldrich)

Huperzin A (Tazhonghui Co., Ltd., China)

Dimethylsulfoxid p. a. (Sigma-Aldrich)

Galanthamin hydrobromid (Changsha Organic Herb Inc., China)

Materiál:

Jako zdroj acetylcholinesterasy byl použit hemolyzát lidských erytrocytů z krve zdravých dobrovolníků. Citrátovaná krev se odstředí a získá se klasicky erytrocytární sediment, který se promyje fosfátovým pufrem pH 7,4, erytrocyty se převedou do 50 ml polykarbonátové kyvety a suspendují přibližně v 5násobném objemu 5 mM fosfátového pufru s obsahem 0,15 M chloridu sodného. Suspenze se centrifuguje 10 minut při 12 000 rpm (centrifuga Sorvall RC2-B s použitím SS34 fixed angle rotor). Promývací procedura se provádí 3x při 0 – 4 °C, pokud není uvedeno jinak.

Erytrocytární stroma se připraví lýzou promytých erytrocytů. Pro zahájení hypotonické hemolýzy se smíchá důkladně 1 ml promyté erytrocytární masy se 40 ml 5 mM fosfátového pufru (fosforečnan sodný) pH 7,4. Hemolýza se provede za míchání 10 minut, potom se erytrocytární stěny sbalí při 20 000 rpm po dobu 10 min. Supernatant a malý tuhý koláč na povrchu se odstraní odtážením. Hmota se promyje 3x fosfátovým pufrem (fosforečnan sodný), pH 7,4. Získají se bělavá oddělená těla erytrocytů.

Jako zdroj butyrylcholinesterasy byla použita lidská plazma.

4.2.3 Přístroje

Centrifuga typ MPW-340 (Mechanika precyzyjna, Varšava, Polsko)

pH metr Φ 72 METER (Beckmann, USA)

UV-spektrofotometr UVIKON 942 (Kontrol instruments, Švýcarsko)

Mikrovýhřevný stolek Boetius

4.2.4 Detekční činidla

D 1: Dragendorffovo činidlo modifikované podle Muniera⁴¹

- pro alkaloidy a ostatní sloučeniny obsahující dusík.

- *roztok A*: se připraví rozpuštěním 1,7 g zásaditého dusičnanu bismutitého a 20 g kyseliny vinné v 80 ml vody.

- *roztok B*: se připraví rozpuštěním 16 g jodidu draselného ve 40 ml vody.

- *zásobní roztok*: připravíme smísením roztoků A a B v poměru 1:1. Ten může být uložený i několik měsíců v chladničce.

- *činidlo pro analýzu*: bylo připraveno tak, že se k roztoku 5 ml kyseliny vinné rozpuštěné v 50 ml vody přidalo 5 ml zásobního roztoku.

D 2: Mayerovo činidlo:⁴²

- 1,35 g chloridu rtuťnatého a 5 g jodidu draselného se rozpustí ve vodě a doplní se jí do 100 ml.

4.2.5 Chromatografické adsorbenty

A 1: Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck, 5×10 cm

Hliníková deska s vrstvou silikagelu pro tenkovrstvou chromatografii. Silikagel 60 F₂₅₄, tloušťka vrstvy 0,2 mm.

A 2: Oxid hlinitý neutrální, 0,1 – 0,25 mm

A 3: Silufol UV 254, Kavalier Votice, 20×10 cm

Komerční chromatografické desky byly před použitím vyvinuty v té chromatografické soustavě, která byla posléze použita k separaci, vysušeny proudem teplého vzduchu a bezprostředně zpracovány.

4.2.6 Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstvou chromatografii

S 1: $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3 + \text{CHCl}_3 + \text{Et}_2\text{NH}$ 45:45:10

S 2: $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3 + \text{EtOH} + \text{Et}_2\text{NH}$ 70:30:4

4.3 Postup izolace alkaloidů z *Papaver somniferum* L.

Ve své diplomové práci jsem se podílela na přípravě základního extraktu, výtřepku A-Et₂O (pH 9 – 10) a jeho dalším rozdělení. Ostatní práce v této části byly provedeny mimo rámec mé diplomové práce, pro pochopení celého postupu a z důvodu pokračování dalších diplomantů je zde však uvádím.

4.3.1 Surovina pro přípravu extraktu

Extrakt byl připraven jako směsný ze dvou částí drog různého původu:

- a) suché zralé makoviny s kousky stonků (sběr 09/2008, Mgr. Vrbovský, Oseva Opava), droga byla rozemleta na částice do 0,5 cm, celková hmotnost 23,0 kg.
- b) suchých zelených nezralých tobolek s kousky stonků do 5 cm (pěstování na ZLR FaF UK, sběr 07-08/2008, nezralé tobolky byly rozříznuty, vyklepány nezralá nevyvinutá semena, tobolky sušeny 2 dny při 50 °C, poté rozemlety na části do 3 mm), celkem 7,0 kg.

4.3.2 Příprava primárního extraktu

Výše uvedené drogy byly smíchány, zality 95% ethanolem denaturovaným methanolem a perkolátor ponechán v klidu po dobu 3 dnů. Celkem bylo použito na 30 kg drogy 265 litrů 95% ethanolu, tj. 1:8,8. Extrakt byl zbaven ethanolu, rozpuštěn ve 2% HCl na pH ~ 2, zředěn vodou, odstraněn chlorofyl obvyklým způsobem, zfiltrován a celkem zředěn na 12 litrů (tmavě hnědý, poněkud pěnící).

4.3.3 Příprava výtřepku A-Et₂O

Roztok byl zalkalizován 1,8 litru 10% uhličitanu sodného pH 9,5 – 10 a vytřepán 4x3 litry etheru, organická fáze byla zfiltrována a odpařena.

4.3.4 Příprava výtřepku Ad-CHCl₃

Roztok po vytřepání etherem byl vytřepán 4x3 litry CHCl₃, organická vrstva se hůře oddělovala. Organická fáze byla zahuštěna, vyloučila se žlutavá práškovitá látka.

4.3.5 Příprava výtřepku Bc-Et₂O

Primární extrakt po chloroformovém výtřepku A byl zalkalizován 50% NaOH na pH 12,5 – 13 (celkem vzniklo 16,3 litru roztoku) a vytřepán 5x4 litry Et₂O. Etherový roztok byl po ostrém oddělení (fáze se dobře dělily) odpařen.

4.3.6 Příprava výtřepku Bd-CHCl₃

Po okyselení malého množství silně alkalického primárního extraktu z předchozího vytřepávání kyselinou sírovou bylo přidáno Mayerovo činidlo, vznikl velmi jemný zákal, a proto nebylo provedeno vytřepávání chloroformem, ale bylo provedeno srážení zbytkových alkaloidů do formy mayerátu.

4.3.7 Příprava kvartérních jodidů J

Kvartérní jodidy nebyly připravovány, ale kvartérní báze byly získány ve formě mayerátu.

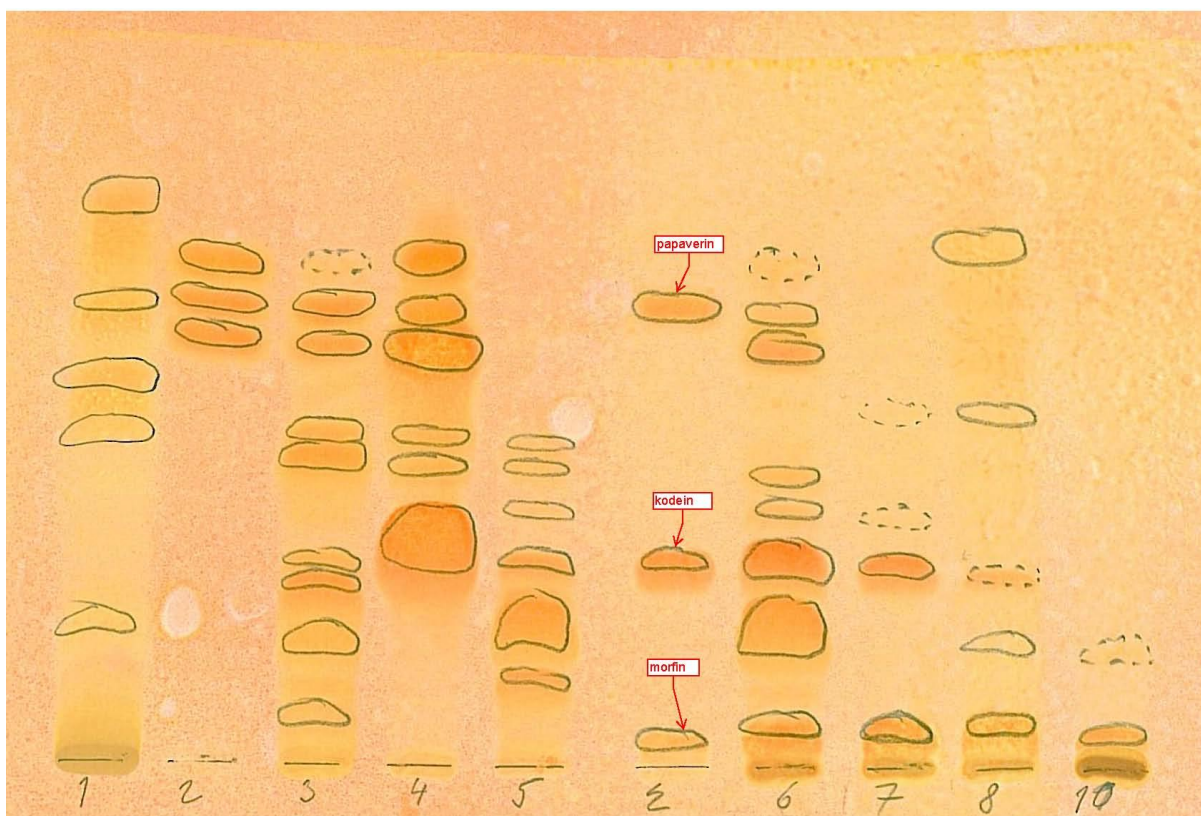
4.3.8 Příprava kvarterních alkaloidů Q

Primární extrakt silně alkalický z vytřepávání etherem při pH 13 byl zneutralizován 3M H₂SO₄ na pH 3 (během této operace hnědý roztok výrazně zesvětlá, zpracováno 17 litrů), zbytek alkaloidů byl vysrážen přidavkem Mayerova činidla (1 litr). Po sedimentaci drobné černé sraženiny byla provedena dekantace, filtrace na Büchnerově nálevce, sraženina promyta destilovanou vodou (nevážena, odhadem asi 10 g) a rozpuštěna v MeOH za použití ultrazvuku.

Tab. 1 Spojené výtřepky ze směsné makoviny

Označení	Úprava roztoku*	Odparek	Popis
A-Et ₂ O	Na ₂ CO ₃ , pH ~9	51 g	Tmavě hnědý, velmi visk.
Ad-CHCl ₃	0, pH ~9 (7)	35,6 g	Tmavě hnědý, při zahušťování se vylučovala bělavá práškovitá hmota.
Výsledky po čištění výtřepku A:			
L	A/Et ₂ O rozp. v HCl, pH~1-2, (1)	2,85 g	Tmavě hnědý, řídce viskózní, bez náznaku krystalů
AC Cl ⁻ rozpustné v chloroformu	AC ₁ Nefenolové (nF, 2)	K: 4,36 g ML: 1,81 g	Světle okrové drobné kryst. Tmavě hnědý, velmi visk.
	AC ₂ Fenolové (F, 3)	0,55 g	Tmavě hnědý, velmi visk. nekystalický
AD Cl ⁻ nerozpustné v chloroformu	AD _{1c} (baze R v Et ₂ O) Nefenolové (nF, 4)	5,26 g	Světle hnědý medový, velmi viskózní
	AD _{2c} (baze R v Et ₂ O) Fenolové (F, 5)	7,48 g	Světle hnědý, hrubě krystalický
	ADd (baze rozp. jen v CHCl ₃ , 6)	12,25 g	Tmavě hnědý, nafouklý
Sumární hmotnosti ostatních odparků			
Bc (rozp.v Et ₂ O)	NaOH, pH~13 (8)	1,07 g	Tmavě hnědý, velmi viskózní s bb krystaly
Bd (rozp.v CHCl ₃)	Nezprac. (9)	000	---
J	Nezprac.	000	---
Q	Mayerát (10)		

* čísla tučně v závorce označují typ výtřepku (popis na TLC)



Obr. 2 TLC frakcí makoviny

(Kieselgel Merck, UV 254 nm, toluen+CHCl₃+Et₂NH 45+45+10, komora nasycená, vyvíjení 1x, detekce UV 254 nm, Dragendorff. činidlo)

- 1 L (Et₂O, pH~1)
 - 2 AC₁ (chloridy alkaloidů R v CHCl₃, nefenolické)
 - 3 AC₂ (chloridy alkaloidů R v CHCl₃, fenolické)
 - 4 AD_{1c} (chloridy alkaloidů nR v CHCl₃, nefenolické, báze rozp. v Et₂O)
 - 5 AD_{2c} (chloridy alkaloidů nR v CHCl₃, fenolické, báze rozp. v Et₂O)
 - 6 ADd (chloridy alkaloidů nR v CHCl₃, báze rozp. v CHCl₃)
 - 7 Ad (pH~10, výtřepek CHCl₃)
 - 8 Bc (pH~12, výtřepek Et₂O)
 - 9 Bd (pH~12, výtřepek CHCl₃) – zde nebyl
 - 10 Q (kvartérní báze ve formě Cl⁻ připravené z mayerátu)
- Σ standardy: papaverin+kodein+morfin (v pořadí podle klesajících R_F)

4.3.9 Zpracování výtřepku A-Et₂O (pH 9 – 10)

Vzhled a hmotnosti odparků jsou uvedeny v tab. 1.

4.3.9.1 Znečištěniny z kyselého roztoku a nebazické alkaloidy

Odparek A (51 g) byl rozpuštěn ve 350 ml 2% HCl za tepla, po zchlazení zředěn vodou a doplněn do 900 ml (pH~ 1). Tento kyselý roztok byl vytřepán 4x250 ml Et₂O.

4.3.9.2 Chloridy alkaloidů rozp. v CHCl₃ (AC)

Vodná fáze (pH~1) byla vytřepána 4x300 ml CHCl₃, fáze se poměrně dobře dělily, na rozhraní zůstávala jen malá mezifáze (1 cm). Hnědý roztok byl odpařen.

4.3.9.3 Chloridy alkaloidů rozp. v CHCl₃, nefenolových (AC₁)

Odparek chloridů rozpustných v chloroformu byl rozpuštěn ve 300 ml 2% HCl, přidáno 300 ml vody (pH~1), roztok zfiltrován a alkalizován 10% Na₂CO₃ (pH~10), vytřepán 3x200 ml Et₂O, spojené etherové výtřepky vytřepány 3x200 ml 2% HCl, kyselý roztok zalkalizován 10% Na₂CO₃ na pH~10 a znova vytřepán 3x200 ml Et₂O. Tento etherový roztok byl promyt 3x50 ml 5% NaOH, poté 2x100 ml vody.

Promytý etherový výtřepok byl vysušen Na₂SO₄ a odpařen.

4.3.9.4 Chloridy alkaloidů rozp. v CHCl₃, fenolových (AC₂)

Louhové roztoky fenolátů a promývací voda byly spojeny, zneutralizovány a okyseleny na pH~2 (ca 600 ml), zalkalizovány 10% Na₂CO₃ na pH~10 a mléčně zakalená suspenze vytřepána 3x200 ml Et₂O. Etherový výtřepok byl vysušen Na₂SO₄ a odpařen.

4.3.9.5 Chloridy alkaloidů nerozp. v CHCl₃, báze rozpustné v Et₂O (AD)

Kyselá vodná fáze po odstranění chloridů rozpustných v chloroformu byla zalkalizována 10% Na₂CO₃ na pH 9 – 10 (objem 1400 ml) a suspenze vytřepána 6x 600 ml Et₂O. Roztok nebyl odpařen, ale zpracováván dále.

4.3.9.6 Chloridy alkaloidů nerozp. v CHCl₃, nefenolových (AD₁)

Etherový výtřepok (3600 ml) připravený jak je uvedeno výše byl promyt 3x120 ml 5% roztoku NaOH (fenoláty, velmi intenzívně hnědý roztok), potom 2x150 ml vody. Alkalické a vodné fáze byly spojeny. Promytá etherová fáze světle žluté barvy byla odpařena dosucha.

4.3.9.7 Chloridy alkaloidů nerozp. v CHCl_3 , fenolových (AD_2)

Hnědý roztok fenolátů z předcházejícího vytřepávání (~1400 ml) byl zneutralizován teprve 15% HCl na $\text{pH} \sim 2$, potom 10% Na_2CO_3 na $\text{pH} 9 - 10$. Světle hnědá sraženina alkaloidů, která se vyloučila, byla vytřepána 4x400 ml Et_2O . Etherový roztok byl odpařen.

4.3.9.8 Chloridy alkaloidů neroz. v CHCl_3 (AD), báze nerozp. v Et_2O (ADd)

Zbytek vodné fáze z chloridů nerozpustných v chloroformu obsahoval po vytřepání Et_2O ještě výrazné množství alkaloidů (po reakci s Mayerovým činidlem), proto byl při $\text{pH} 9 - 10$ vytřepán 5x 300 ml CHCl_3 .

4.3.10 Sloupcová chromatografie výtřepku AC_1 *Papaver somniferum* L.

Při TLC analýze vyloučeného pískovitého krystalického podílu a matečného louhu bylo zjištěno, že se prakticky kvalitativně neliší – obsahuje tři hlavní alkaloidy a stopová množství minimálně dvou alkaloidů dalších. Proto bylo chromatografické dělení realizováno směsí obou výchozích surovin.

Čištění odparku přes oxid hlinitý

Matečný loup odparku AC_1 (1,81 g) byl rozpuštěn ve 45 ml chloroformu, přidáno 5 ml benzínu (40-60 °C), roztok byl vlit na sloupec s neutrálním oxidem hlinitým 0,1 – 0,25 mm a promyt 250 ml této směsí (chloroform+benzín 9:1). Vzniklo 1,45 g nahnědlého zčásti krystalického odparku.

Tab. 2 Sloupcová chromatografie výtřepku AC_1 *Papaver somniferum* L.

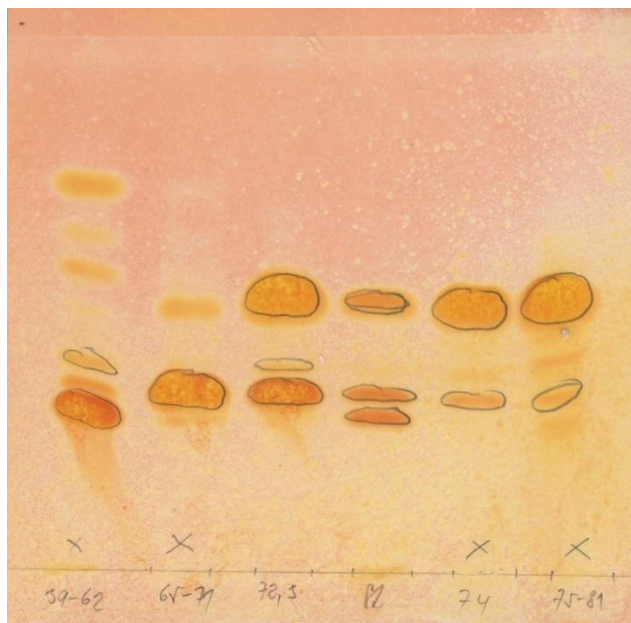
Označení vzorku	AC_1 – předčištěný matečný loup + část krystalů
Hmotnost vzorku	1,45 g ML + 0,76 g vyloučené směsi krystalů
Druh a množství adsorb.	Al_2O_3 neutr., st. akt. III (desaktivovaný 5 % vody), 140/250 μm , 140 g
Vrstva s extraktem	2,5x1,7 cm
Dělicí vrstva	2,5x74,5 cm
Frakce (ml)/doba toku	50 ml/ca 20 min.



Obr. 3 Kontrolní TLC: Kieselgel 60 F254 nm, To+EtOH+Et₂NH 70:30:4, vyvíjení 2x, detekce UV 254 nm, Dragendorffovo činidlo.

Tab. 3 Výsledky sloupkové chromatografie matečného louhu

Spoj. frakce	Č. frakce	Eluční systém	Hmotnost	Popis (Poznámka)
1-38	1-11	Benzín : CHCl ₃ 9:1	0	Světle hnědý, olej., zanedbatelné hmotnosti, bez obsahu alkaloidů
	12-26	Benzín : CHCl ₃ 8,5:1,5		
	27-38	Benzín : CHCl ₃ 8:2		
39-62	39-56	Benzín : CHCl ₃ 8:2	0,800 g	Světle žlutý, krystalický
	57-58	Benzín : CHCl ₃ 7,5:2,5		
	59-62	Benzín: CHCl ₃ 7,5:2,5		
63-64	63-64	Benzín : CHCl ₃ 7:3	0	Světle hnědý, olej., bez alkaloidů
65-71	65-71	Benzín : CHCl ₃ 7:3	0,565 g	Nažloutlý, krystalický
72-73	72-73	Benzín : CHCl ₃ 7:3	0,390 g	Světle hnědý, krystalický
74	74	Benzín : CHCl ₃ 7:3	0,148 g	Světle hnědý, krystalický
75-81	75-81	Benzín : CHCl ₃ 7:3	0,464 g	Světle hnědý, krystalický
82-100	82-100	CHCl ₃	2,367 g	Hnědý, nekrystalický



Obr. 4 Kontrolní TLC: Kieselgel 60 F₂₅₄ nm, To+EtOH+Et₂NH 70:30:4, vyvíjení 2x, detekce UV 254 nm, Dragendorffovo činidlo.

4.3.11 Čištění spojených frakcí 72-81

1,002 g odparku bylo dále čištěno preparativní TLC za následujících podmínek (tab. 4)

Tab. 4 Čištění alkaloidů ze spojených frakcí 72-81

Frakce-popis	Nažloutlý, krystalický
Hmotnost vzorku	1,002 g, světle hnědý s náznaky krystalů
Chrom. desky	Silufol UV 254 nm (Kavalier Sázava), 10x20 cm
Počet desek, linie	57 desek, nanášecí linie 18 cm
Eluční systém, vyvíjení	To+EtOH+Et ₂ NH 70:30:4, vyvíjení 2x
Dráha	8,5 cm (10 cm celá deska)
Detekce	UV 254 nm
Izolované zóny	R _f 0,41 (H: horní zóna): 454 mg R _f 0,26 (D: dolní zóna): 80 mg

Po vysušení desek byly zóny separovány, absorbenty byly v oddělených chromatografických kolonkách eluovány vždy 50 ml směsi CHCl_3 + EtOH 1:1 a eluáty odpařeny.

Odparek zóny D (80 mg) byl předán diplomantce Tamaře Rosikové pro další zpracování. Odparek zóny H (454 mg) byl rozpuštěn v 5 ml CHCl_3 , roztok byl zfiltrován přes sloupeček s obsahem 5 g neutrálního oxidu hlinitého (40 – 250 μm , deaktivovaný 5 % vody, průměr \times výška = 10 \times 40 mm) a následně promyt 30 ml CHCl_3 . Po odpaření eluátu bylo získáno 390 mg téměř bezbarvého krystalického odparku, který po rekrystalizaci z EtOH poskytl 211 mg bezbarvých silných jehlic, označených PS – 03, t. tání 174–175 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -196° (c 0,98, chloroform).

4.4 URČENÍ STRUKTURY IZOLOVANÉ LÁTKY

4.4.1 Měření hmotnostního spektra

Spektra byla měřena na LC/MS Thermo Finnigan LCQDuo, iontová past, ionizace elektrosprejem v kladném módu (ESI+). Látka byla rozpuštěna v methanolu.

4.4.2 Měření NMR spektra

Spektra jsou měřena na spektrometru Varian Inova 500 s pracovní frekvencí 499.9 MHz pro ^1H a 125.7 MHz pro ^{13}C jádra. ^{13}C NMR spektra byla měřena v 5 mm SW širokopásmové sondě, ^1H a všechna 2D spektra v inverzní 5mm ID PFG sondě s využitím standardních pulzních sekvencí. Experimenty byly měřeny v deuteriochloroformu při 25 °C.

Hodnoty chemických posunů jsou v ppm a jsou vztaženy k internímu standardu (hexamethyldisilan, 0,04 ppm, v ^1H spektrech) nebo signálu solventu (76,99 ppm, v ^{13}C spektrech). (Ing. M. Kurfürst, Ph.D., AV ČR Ústav chemických procesů, Praha).

4.5 STANOVENÍ ÚČINKU ALKALOIDU NA ERYTROCYTÁRNÍ AChE (IC_{50})

4.5.1 Podmínky měření

Experimenty byly prováděny za těchto podmínek:

- při teplotě 25 °C
- v prostředí PB
- při pH 7,4
- při vlnové délce spektrofotometru 436 nm
- v jednorázových plastových kyvetách o tloušťce 1 cm

4.5.2 Stanovení anticholinesterasové aktivity

Pro stanovení aktivity látek byla použita Ellmanova spektrofotometrická metoda, využívající 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoovou kyselinu). Za substráty byly zvoleny estery thiocholinu (acetylthiocholin, butyrylthiocholin), které jsou esterasami štěpeny na thiocholin a příslušnou kyselinu. Principem reakce je vazba thiolové skupiny thiocholinu s DTNB za vzniku žlutě zbarveného produktu o $\lambda_{\text{max}} = 436 \text{ nm}$, který je stanoven spektrofotometricky. Při tomto stanovení je sledován nárůst absorbance za 1 minutu.

Slepý vzorek – do kyvety je postupně přidáváno 10 – 25 µl hemolyzátu nebo plazmy, 200 µl DTNB, 25 µl rozpouštědla, ve kterém jsou rozpuštěny vzorky (DMSO) a doplní se na objem 900 µl pufrům. Následně je přidáno 100 µl substrátu (acetylcholin jodid nebo butyrylcholin jodid). Nárůst absorbance je měřen při vlnové délce 436 nm. Měření je prováděno ve třech opakováních. Pro výpočet poklesu nárůstu absorbance byla použita průměrná hodnota.

Měření vzorku – do kyvety je postupně přidáváno 10 – 25 µl hemolyzátu nebo plazmy, 200 µl DTNB, 25 µl měřeného vzorku v různých koncentracích a doplní se na objem 900 µl pufrům. Následně je přidáno 100 µl substrátu (acetylcholin jodid nebo butyrylcholin jodid). Nárůst absorbance je měřen při vlnové délce 436 nm. Měření je prováděno ve třech opakováních.

4.5.3 Matematické zpracování experimentálních dat

Hodnoty IC_{50} byly vypočítány z naměřených hodnot poklesu aktivity acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy nelineární regresí v programu GraphPad Prism (verze 3.02 pro Windows, Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

Výpočet poklesu ΔA

$$\% \text{ poklesu } \Delta A = 100 - (\Delta ASA / \Delta ABL \times 100)$$

ΔASA – nárůst absorbance za 1 minutu u měřeného vzorku

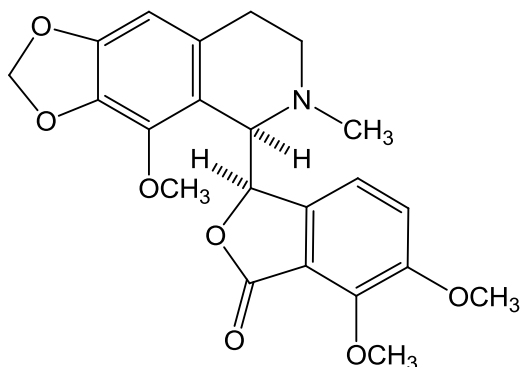
ΔABL – nárůst absorbance za 1 minutu u slepého vzorku

5. VÝSLEDKY

5.1 PŘEDBĚŽNÉ URČENÍ STRUKTURY LÁTKY PS – 03

5.1.1 Hmotnostní spektroskopie

ESI-MS m/z (%) 414.13 $[M+H]^+$ (100), MS/MS (fragmentace piku m/z 414.13): m/z (%) 205.13 (3.4), 220.17 (100), 353.13 (7.5), 365.05 (4.2)



narkotin 1R, 9R forma

Na základě fragmentace ESI-MS lze předpokládat, že izolovaná látka je narkotinem, výsledky ^1H - a ^{13}C -NMR spekter, jejichž měření provádí Ing. M. Kurfürst, Ph. D, (Akademie věd ČR, Ústav chemických procesů, Praha) nejsou ještě k dispozici

5.1.2 Srovnání na základě fyzikálně chemických charakteristik

Pro další identifikaci látky byl použit vzorek narkotinu ze sbírky doc. RNDr. L. Opletala, CSc.

Směsná teplota tání: 174 – 176 °C (bez deprese)

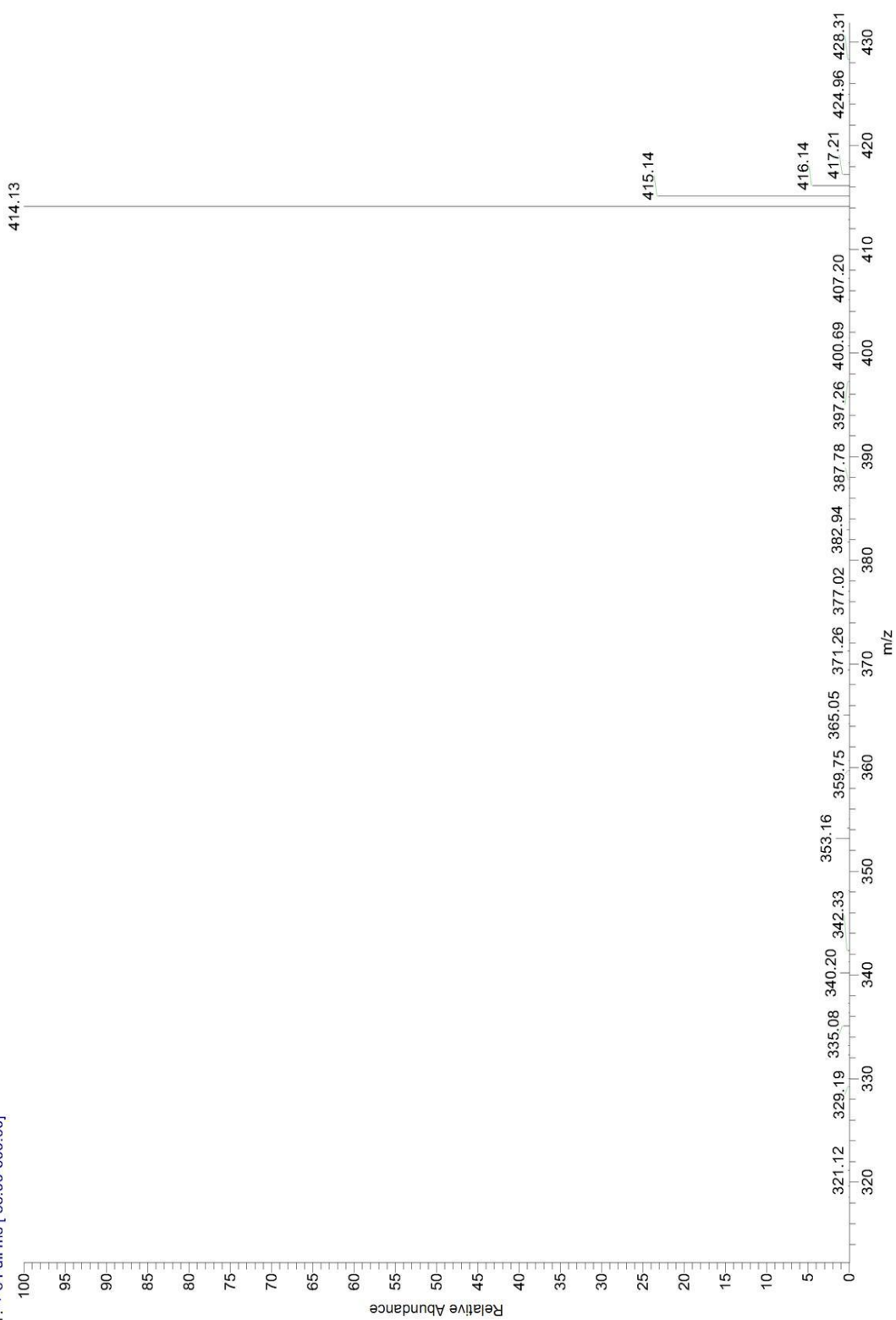
Tenkovrstvá chromatografie:

Kieselgel 60 F254 nm, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3 + \text{CHCl}_3 + \text{Et}_2\text{NH}$ 70:30:4, vyvíjení 2x, detekce UV 254 nm, Dragendorffovo činidlo, R_F 0,50

Kieselgel 60 F254 nm, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3 + \text{CHCl}_3 + \text{Et}_2\text{NH}$ 70:30:4, vyvíjení 2x, detekce UV 254 nm, Dragendorffovo činidlo, R_F 0,84 (zóny identické)

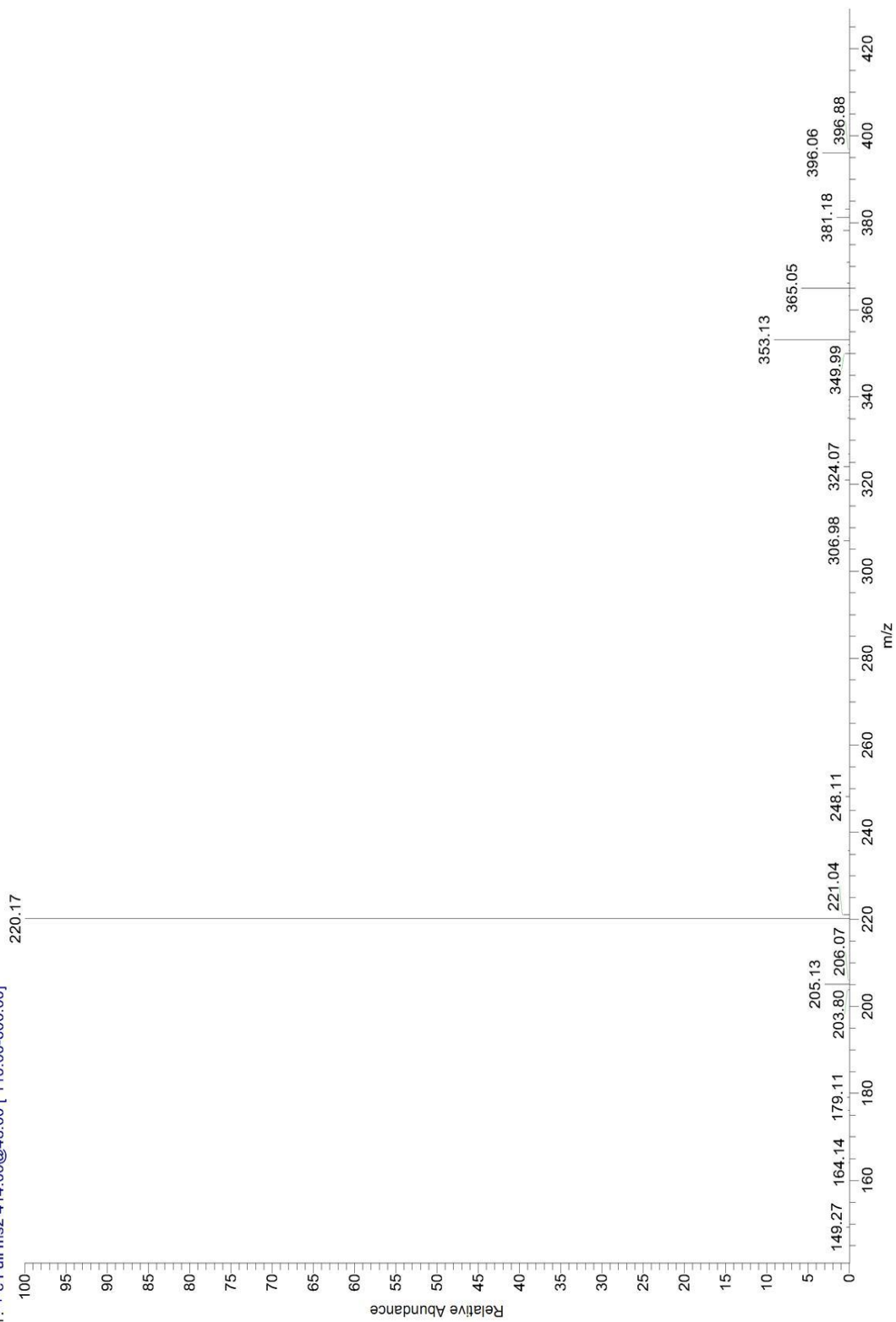
Stanovení optické otáčivosti $[\alpha]_D^{20}$ -196° (c 0,98, chloroform).

LC 103 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.82E8
T: + c Full ms [55.00-600.00]



Obr. 5 MS látky PS - 03

LC 103 MS2 414 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.20E8
T: + c Full ms2 414.00@48.00 [110.00-600.00]



Obr. 6 MS/MS látky PS-03

5.2 STANOVENÍ HODNOT IC_{50}

Tab.5 Hodnoty IC_{50}

vzorek	IC_{50} mM AChE	IC_{50} mM BuChE
narkotin PS – 03	>1000	>1000
galanthamin	$6,9 \pm 0,03$	$156 \pm 0,69$
huperzin	$0,25 \pm 0,01$	>1000

Hodnoty % inhibice při $c = 1$ mM nejsou uváděny.

6. DISKUSE

Alzheimerova choroba je nejvýznamnějším neurodegenerativním onemocněním současné doby, má progresivní incidenci a nelze předpokládat, že tento stav se změní k lepšímu.¹⁰ Z tohoto důvodu jsou hledány nová potenciální léčiva, která by se mohla podílet na zastavení průběhu této choroby a to zejména v raných a středních fázích. Jednou z oblastí hledání potenciálních léčiv je využití sekundárních metabolitů rostlin a hub. Mezi chemické látky, které se zdají být v tomto směru atraktivní, patří také alkaloidy, zejména alkaloidy isochinolinové. Skupina těchto alkaloidů je velmi široká, poskytuje velké množství typových chemických struktur s různými biologickými účinky (řada isochinolinových alkaloidů je oficiálními léčivy) a je nutné konstatovat, že většina těchto sloučenin nebyla podrobena širšímu screeningu na biologické účinky.

Tato práce je součástí širšího systematického screeningu sledování vlivu alkaloidů na lidskou mozkovou tkáň. Ve své práci jsem se zaměřila na izolaci jednoho terciárního alkaloidu z makoviny (*Papaver somniferum* L.) Způsobem obvyklým pro izolaci těchto látek jsem získala sloučeninu označenou PS – 03, předběžně určenou jako narkotin. Podílela jsem se na přípravě základního extraktu makoviny, výtřepku A-Et₂O při pH 9 – 10 (terciární baze méně polární) a jeho dalším rozdělení. Získaný výtřepok byl podroben sloupcové chromatografii, frakce 72 – 81 jsem dále čistila preparativní TLC. Na základě zpracování zón stejné kvality jsem získala 390 mg hrubého krystalického odparku, který po rekrystalizaci z ethanolu poskytl 211 mg bezbarvých silných jehlic označených PS – 03, teplota tání 174 – 175 °C, $[\alpha]_D^{20}$ -196° (c 0,98, chloroform). Na základě výsledků hmotnostní spektroskopie, porovnáním s údaji v databázi s látkou z knihovny isochinolinových alkaloidů poskytnuté doc. RNDr. Lubomírem Opletalem, CSc., jednoznačně vyplývá, že se jedná o látku narkotin. Definitivní uzavření struktury však bude možné až po poskytnutí údajů 1H- a 13C-NMR spekter.

Narkotin byl izolován z opia v roce 1804 a v dalších letech intenzivně studován. Se zřetelem k poměrně vysokému poměru narkotinu v opiu (průměrně 5%)²⁰ byla věnována pozornost možnosti využití této látky.

Při srovnání s morfinem má narkotin podstatně slabší narkotický a analgetický účinek. Účinky morfinu jsou údajně narkotinem zesíleny (synergismus) a směs obou alkaloidních bazí může být proto značně toxická a nebezpečná. Narkotin má dobrý antitusický účinek a v současnosti je prakticky používán. Je k dispozici ve formě solí – embonátu, hydrochloridu, který nalézá použití jako praktické antitusikum. (Nipaxon tbl., Noscaper tbl., Tussanyl supp.). Látka neovlivňuje dechové centrum ani funkci střev (nedochází k zácpě). Kromě tohoto účinku u ní nebyly nalezeny žádné významné efekty na CNS, nepůsobí sedativně a nevyvolává také závislost. Občas se vyskytující bolesti na hrudi jsou neškodné.⁴

Literatura uvádí několik účinků narkotinu, které byly v průběhu doby objeveny. Byla srovnávána akutní toxicita některých alkaloidů izolovaných z opia, tyto alkaloidy ukázaly rostoucí toxicitu při perorálním podání v následujícím pořadí narkotin, papaverin, ethylmorfin, kodein, při podkožním podání toxicita rostla v pořadí papaverin, narkotin, ethylmorfin, kodein.⁴³

Při srovnání toxicity u zvířat bylo zjištěno, že narkotin na rozdíl od papaverinu nebo kodeinu vykazuje nízkou toxicitu pro potkana, věk a pohlaví nevykazovaly žádný rozdíl.⁴⁴

Farmakologické studium narkotinu není v současné době významně prováděno, kromě antitusického účinku lze z hlediska toxicity uvést nepříliš významný vliv na některé bakterie (*Escherichia sp.*, *Staphylococcus aureus*).⁴⁵

Narkotin podávaný i. v. kočkám v 5, 10, 15 mg/kg významně neovlivňoval periferní adrenergní či cholinergní systém, v 50 mg/kg postupně snížil tlak, potlačil dýchání a nakonec způsobil smrt srdeční zástavou.⁴⁵ Zdá se, že také perorálně podávaný narkotin není výrazně toxickým alkaloidem.

Látka nevykázala v dřívějších pokusech ani účinky na acetylcholinesterasu.⁴⁶ Z tohoto pohledu se může zdát, že studium alkaloidů *Papaver somniferum* L. na anticholinesterasové účinky nemá význam. Je však nutné říci, že má práce přispívá k širšímu studiu isocholinových alkaloidů a jejich vlivu na jiné metabolické procesy neurodegenerací v lidském mozku (oxidační stres, neuronální zánět, vliv na sekretasy). Na tyto účinky nebyly alkaloidu máku zatím sledovány, nebyla vytvořena širší knihovna těchto sloučenin pro jejich další studium v rámci kombinatorní chemie.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- 1 <http://www.neurol.cz/info/degpaccz.html>, vystaveno 2. 2. 2010.
- 2 Brunovský, M.: *Objektivizace diagnostiky a změn vigility u demencí*. 1. vyd. Gálén, Praha 2003, 13 – 27.
- 3 <http://www.vesmir.cz/clanek/neurodegenerativni-onemocneni>, vystaveno 2. 2. 2010.
- 4 Lüllman, H. a kol.: *Farmakologie a toxikologie*. 15. vyd. Grada Publishing, Praha 2004, 323 – 348.
- 5 Pydychová, E.: *Alzheimerova nemoc*. Solutio, Praha 2002/2003, 21 – 28.
- 6 Opletal, L., Opletalová, V., Jun, D., Kuča, K.: Současné uplatnění některých přírodních látek v terapii demencí Alzheimerova typu. *Sborník 34. konference Syntéza a analýza léčiv*. Farm. fakulta VFU, Brno 12. – 14. 9. 2005, 26 [S18].
- 7 Jiráček, R. a kol.: *Demence a jiné poruchy paměti*. 1.vyd. Grada Publishing, Praha 2009, 11 – 25.
- 8 Šimová, J., Haberman, V.: *Alkaloidy malé laboratorní praktikum*. 1.vyd. Karolinum, Praha 2001, 5.
- 9 Koukolík, F., Jiráček, R.: *Diagnostika a léčení syndromu demence*. 1.vyd. Grada Publishing, Praha 1999, 11 – 40, 153 – 154.
- 10 Koukolík, F., Jiráček, R.: *Alzheimerova nemoc a další demence*. 1.vyd. Grada Publishing, Praha 1998, 213 – 217.
- 11 Cibičková, L., Palička, V.: Alzheimerova choroba, cholesterol a apolipoprotein E. *Klinická biochemie a metabolismus*. 13 (34), 2005, 127 – 130.
- 12 Patočka, J.: Semagacestat – nová cesta v terapii Alzheimerovy nemoci. *Psychiatrie*. 13 (1), 2009, 15.
- 13 Jiráček, R.: Farmakoterapie demencí. *Praktické lékařství*. 4 (6), 2008, 286
- 14 Jiráček, R.: Kognitivní farmakoterapie Alzheimerovy choroby: současný stav a vyhlídky do blízké budoucnosti. *Farmakoterapie*. 6, 2005, 604 – 605, 608.
- 15 Jiráček, R.: Současné trendy v kognitivní farmakoterapii Alzheimerovy choroby. *Neurologie pro praxi*. 2, 2002, 101 – 102, 104.
- 16 Jiráček, R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Klinická farmakologie*. 18, 2004, 213.
- 17 Geršl, V., Štěrbá, M.: *Farmakologie pro farmaceuty II*. 1.vyd. Karolinum, Praha 2007, 18 – 19.
- 18 Chung, Y. K., Heo, H. J., Kim, E. K., Kim, H.K., Huh, T.L., Lim, Y., Kim, S. K., Shin, D. H.: Inhibitory effect of *Artemisia asiatica* alkaloids on acetylcholinesterase activity from rat PC 12 cells. *Mol Cell*. 10, 2000, 253 – 262.

- 19 <http://botany.cz/cs/papaver-somniferum/>, vystaveno 15. 2. 2010.
- 20 Blaschek, W., Ebel, S., Hilgenfeldt, U., Holzgrabe, U., Reichling, J., Schulz, V.: *Papaver*. HagerRom. Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 2008, 1, 2, 8 – 29.
- 21 <http://rostlinyprirodou.cz/makovite/>, vystaveno 20. 2. 2010.
- 22 <http://www.biotox.cz/enpsyro/pj3rpas.html>, vystaveno 21. 2. 2010.
- 23 Hosnedl, V. a kol.: *Rostlinná výroba – II*. 1.vyd. Česká zemědělská univerzita, Praha 1998, 147 – 148.
- 24 Kokoška, L.: *Spices, aromatic and medical plants of tropics and subtropics*. 1.vyd. Česká zemědělská univerzita, Praha 2004, 199 – 200.
- 25 Zehnálek, Petr.: *Seznam doporučených odrůd 2006*. 1.vyd. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno 2006, 86.
- 26 Novák, J., Preininger, V.: *Taxonomické a fytochemické hodnocení rodu Papaver*. 1.vyd. Vysoká škola zemědělská, Praha 1981, 21 – 22, 43 – 45.
- 27 Bechyně, M.: *Základy pěstování máku*. 1.vyd. Institut výchovy a vzdělávání ministerstva zemědělství ČR, Praha 1993, 3.
- 28 <http://lekarske.slovniky.cz/pojem/narcein>, vystaveno 3. 3. 2010.
- 29 Guinaudeau, H. Shamma, M.: *J. Nat. Prod.* 1982, 45, 237.
- 30 Song, L. S. Ren, G. J. Chen, Z. L. Chen, Z. H. Zhou, Z. N. Cheby, H.: *Br. J. Pharmacol.* 2000, 129, 893.
- 31 Saeed, S. A. Gilani, A. H. Majoo, R. U. Shah.: *Pharmacol. Res.* 1997, 36.
- 32 Berkov, S., Bastida, J., Nikolova, M., Viladomat, F., Codina, C.: Rapid TLC/GC-MS identification of acetylcholinesterase inhibitors in alkaloid extracts. *Phytochemical analysis*. 19 (5), 2008, 411 – 419.
- 33 Whiteley, C. G., Daya, S.: Isoquinoline alkaloids as inhibitors of acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus*. *J. of enzyme inhibition*. 9(4), 1995, 285 – 294.
- 34 Diop, M. F., Hehn, A., Ptak, A., Chretien, F., Doerper, S., Gontier, E., Bourgaud, F., Henry, M., Chapleur, Y., Laurain-Mattar, D.: Hairy root and tissue cultures of *Leucojum aestivum* L. – relationships to galanthamine content. *Phytochemistry Reviews*. 6(1), 2007, 137 – 141.
- 35 Levi, M. S., Brimble M. A.: *Current Medicinal Chemistry*. 11, 2004, 2388.
- 36 http://www.zbynekmlcoch.cz/inc_medic/amyloidni_protein.doc, vystaveno 2. 3. 2010

- 37 Geerts, H., Grossberg, G., T.: Pharmacology of acetylcholinesterase inhibitors and N-methyl-D-aspartate receptors for combination therapy in the treatment of Alzheimer's disease. *J. of Clinical Pharmacology*. 46(7), 2006, 8 – 16.
- 38 Rossom, R., Adityanjee, Dysken, M.: Efficacy and tolerability of memantine in the treatment of dementia. *J. of Geriatric Pharmacotherapy*. 2(4), 2004, 303 – 312.
- 39 <http://www.agromanual.cz/cz/clanky/management-a-legislativa/legislativa/ohlasovaci-povinnost-osob-pestujicich-mak-sety-a-konopi.html>, vystaveno 5. 3. 2010.
- 40 Bajgar, J.: Stanovení aktivity cholinesteráz v lidské krvi – možná modifikace pro polní použití. *Vojenské zdravotní listy XLI*. 1972, 78 – 80.
- 41 Stahl, E.: Thin-layer Chromatography, *A Laboratory Handbook*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1969, 873.
- 42 *Československý lékopis*. Vyd. 4. Svazek I. Avicenum, Praha 1987, 361.
- 43 Aurousseau, M., Navarro, J.: Comparative acute toxicity of some alkaloids derived from opium. *Pharm. Franc.* 15, 1957, 640 – 653.
- 44 Drommond, F. G., Johnson, C., Poe, Ch.: Toxicity of some opium alkaloids. *Acta Pharm. et Tox.* 6, 1980, 235 – 249.
- 45 Sukhinina, G. P.: Pharmacological properties of noscapine. *Farm. i Toks.* 31(6), 1968, 702 – 705.
- 46 Ota, Y., Endo, N., Hirasawa, M.: Antitussive activity of narcotine derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* 12(5), 1964, 569 – 578.

8. ABSTRAKT

Suchánková, P.: Biologická aktivita obsahových látek rostlin XIV. Alkaloidy *Papaver somniferum* L. a jejich účinek na acetylcholinesterasu. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie, Hradec Králové 2010, 57 stran.

V rámci studia rostlin s obsahem alkaloidů, které inhibují aktivitu lidské erytrocytární acetylcholinesterasy a sérové butyrylcholinesterasy, byl sledován mák setý (*Papaver somniferum* L.).

K izolaci bylo použito 30 kg makoviny. Primární extrakt byl připraven perkolací 95% EtOH. Z tohoto extraktu byly sekvenčním postupem připraveny výtřepky jednotlivých typů alkaloidů.

V této diplomové práci byl zpracován výtřepok A-Et₂O (méně polární báze, pH 9 – 10). Alkaloidy tohoto výtřepku byly rozděleny na báze, jejichž chloridy jsou rozpustné i nerozpustné v chloroformu. Z každé uvedené frakce byly dále získány alkaloidy fenolické a nefenolické.

Práce spočívala v dělení alkaloidů výtřepku AC₁ (chloridy rozpustné v CHCl₃, nefenolické), z této směsi byl pomocí sloupcové chromatografie na Al₂O₃, preparativní TLC izolován narkotin, látka byla předběžně identifikována na základě hmotnostního spektra, teploty tání, optické otáčivosti a srovnáním se standardem.

Při sledování vlivu narkotinu na lidskou AChE a BuChE a následném matematickém výpočtu byla pro narkotin stanovena hodnota IC₅₀ >1000 pro AChE a IC₅₀ >1000 pro BuChE.

Klíčová slova: *Papaver somniferum*, narkotin, alkaloidy, acetylcholinesterasa.

Suchánková, P.: Biological activity of plant metabolites XIV. Alkaloids of *Papaver somniferum* L. and their activity to acetylcholinesterase. Diploma thesis, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology, Hradec Králové 2010, 57 pages.

Within the screening of plants containing alkaloids potentially inhibiting human erythrocytic AChE and human butyrylcholinesterase was studied poppy (*Papaver somniferum* L.)

It was used 30 kg of poppy straw, basic extract was prepared by extraction of 95% alcohol. From this primary extract were prepared extracts with individual types of alkaloids by sequent procedue.

In this diploma thesis only one extract was processed (extract type A-ether, pH 9 – 10). Alkaloids from this extract were separated into bases, where its chlorides are soluble and insoluble in chloroform. From each of above mentioned fractions phenolic and non-phenolic alkaloids has been obtained.

In this work were separated alkaloids from extact AC₁ (chlorides soluble in chloroform, non-phenolic. From this mixture was isolated narcotine by the using of column chromatography on alumina and preparative TLC on silica. This compound has been preliminary identified according to data of MS, melting point, optical rotary and by comparison with standard substance.

It has been found following results of biological test on human AChE and BuChE:
IC₅₀ >1000

Keywords: *Papaver somniferum*, narcotin, alkaloids, acetylcholinesterase.